Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin,
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung,
Direktor: Professor Dr. H. Raettig

Über die Wirkung von Kombinationsimpfstoffen aus Enterobacteriaceaen am Modell der oralen Immunisierung der weißen Maus

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der ehem. Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Angelika Marquardsen
aus Berlin

1970

Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin,
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung,
Direktor: Professor Dr. H. Raettig

Über die Wirkung von Kombinationsimpfstoffen aus Enterobacteriaceaen am Modell der oralen Immunisierung der weißen Maus

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der ehem. Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Angelika Marquardsen
aus Berlin

ehem. Dekan:	Professor Dr. med. H. Lax
Referent:	Professor Dr. med. H. Raettig
Korreferent:	Professor Dr. med. B. Schmidt

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der ehem. Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Promotionsdatum: 24. November 1970

Druck: H. Franzen, Berlin 391 23 25

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung	5
B.	Material und Methoden der Versuchsreihe I	9
	a) Versuchstiere	9
	b) Impfstoffe	9
	c) Immunisierung	10
	d) Infektion	10
C.	Ergebnisse der Versuchsreihe I	11
D.	Material und Methoden der Versuchsreihe II	24
	a) Versuchstiere	24
	b) Impfstoffe	24
	c) Immunisierung	26
	d) Infektion	26
E.	Ergebnisse der Versuchsreihe II	27
F.	Diskussion	39
G.	Zusammenfassung	46
H.	Literaturverzeichnis	48

Die Arbeit enthält 16 tabellarische Übersichten und 4 Abbildungen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546510_0099

A. Einleitung

Die epidemiologische Lage in Europa und Nordamerika mit der Abnahme von Typhus und Paratyphus nach dem zweiten Weltkrieg und der Zunahme von Enteritiden, die zu einem großen Teil von Salmonellen hervorgerufen werden (16, 37), macht Versuche für wirksame seuchenprophylaktische Maßnahmen erforderlich. Die wirksamste diesbezügliche Maßnahme wäre eine Impfung; diese müßte berücksichtigen, daß die Salmonellenenteritis eine lokale Infektionskrankheit des Darmes ist, und nur eine lokale, hier oral vorzunehmende Immunisierung einen wirksamen Schutz aufbauen kann (17, 31, 39). Weiter wäre daran zu denken, daß eine Impfung bei der großen Anzahl potentieller Enteritiserreger nur dann seuchenprophylaktisch sinnvoll wäre, wenn der Impfstoff gegen mehrere Erreger gleichzeitig schützen könnte. Ein polyvalenter Schutz wäre einmal zu erreichen, wenn der Impfstoff eine unspezifische Wirkung hätte und zum anderen, wenn sich in dem Impfstoff mehrere Erreger gleichzeitig ohne eine gegenseitige Minderung ihrer Wirkung auf die Antikörperbildung kombinieren ließen.

RAETTIG (34) konnte nachweisen, daß ein oraler Impfstoff tatsächliche eine breite erregerunspezifische Wirkung gegen darmpathogene Erreger aufweist, da er Mäuse durch eine lokale Impfung mit verschiedenen nicht verwandten Antigenen gegen eine orale S. typhi murium - und S. enteritidis-Infektion schützen konnte. KURSCHILGEN (19), LIETZ und RAETTIG (21) zeigten tierexperimentell, daß diese unspezifische Immunität in die Darmwand zu lokalisieren ist und vorwiegend von pathogenetischen Eigenschaften der virulenten Keime bestimmt wird, und daß diese unspezifische Immunität bei der von ihnen gewählten Versuchsanordnung einer intraperitonealen Infektion der geimpften Tiere nicht zur Wirkung kam. Ihre Versuche, neben denen von KINNE SAFFRAN (16), lassen vermuten, daß eine über die lokale Abwehr hinaus wirkende allgemeine

Immunität, die wesentlich spezifischer hinsichtlich der Übereinstimmung von somatischen Antigenen zu sein scheint, die wirksame Komponente bei der intraperitonealen Infektion ist. Meine Aufgabe war es nun, tierexperimentell zu prüfen, ob in einem oralen Impfstoff zwei oder mehrere Erreger ohne eine Beeinträchtigung der antigenen Einzelwirkung zu kombinieren sind.

Nach GÄRTNER (10) wäre als Möglichkeit der gegenseitigen Antigenwirkung eine konkurrierende hemmende, eine verstärkte Wirkung im Sinne eines Synergismus oder das Fehlen einer Wechselwirkung in Betracht zu ziehen, wobei eine die Antikörperbildung adjuvantiv stimulierende Wirkung für eine Impfplanung als besonders günstig anzusehen wäre.

Zunächst wurde die Frage, welche der aufgeführten theoretischen Antigenwechselwirkungen auftreten würde, bei der Kombination von zwei enteropathogenen Erregern verschiedener Gattungen, S. schwarzengrund und E. Coli, in einer ersten Versuchsreihe untersucht.

Die Bakterien wurden zur Herstellung eines spezifischen, eines unspezifischen und eines Kombinationsimpfstoffes verwendet. Es war zu prüfen, ob durch die Anwendung der drei Impfstoffe eine antitoxische Immunität zu erzielen ist, die sowohl vor einer Infektion mit virulenten E. Coli-Keimen als auch vor einer S. schwarzengrund-Infektion schützt.

Die Immunisierung wurde durch eine orale Impfung vorgenommen, die Infektion mußte künstlich über eine intraperitoneale Belastung erfolgen. Sowohl S. schwarzengrund als auch E. Coli sind für die Maus auf natürlichem enteralem Wege apathogen (16, 17, 21).

Folgende Fragen stellen sich aus der Anordnung der ersten Versuchsreihe:

I) Ermöglicht die orale Immunisierung hier auch eine Abwehr, die bei dieser intraperitonealen Infektion

von virulentem Keimmaterial wirksam wird, wie bereits in den Versuchen von KINNE-SAFFRAN (16), KURSCHILGEN (19), LIETZ und RAETTIG (17, 21) erwiesen?

II) Wird von den drei verschiedenen Impfstoffen der gleiche Immunitätsgrad erzielt oder sind unterschiedliche Schutzwerte zu beobachten?

III) Ist bei einer differierenden Höhe der jeweiligen Schutzwirkung vor einer intraperitonealen Infektion ein Hinweis auf die Art der Immunität, die von einer oralen Impfung induziert wird, enthalten?

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Zahl der Antigenbestandteile der Impfstoffkombination auf 13 erweitert, um zu sehen, wie sich die gegenseitige Antigenwirkung bei einer größeren Antigenzahl verhält.

In jeder der Antigenmischungen war der Stamm S. schwarzengrund enthalten. Dieser Erreger bildet in dieser Versuchsreihe das Beispiel einer spezifischen Immunisierung; eine S. schwarzengrund-Immunisierung wurde daher als eine positive Kontrolle mitgeführt. Eine Impfung mit dem gruppengleichen Keim S. typhi murium stellte eine unspezifische Immunisierung bei einer Übereinstimmung der Gruppenantigene O 1, 4 und 12 dar. Als weitere Bestandteile der Impfstoffkombination wurden Erreger, die der enterotoxischen Bakteriengruppe zuzurechnen sind, verwendet. Ihre Auswahl erfolgte ungeachtet von Unterschieden im Antigenaufbau, Pathogenität und Virulenz. In den verschiedenen Impfstoffkombinationen wurde das spezifische Antigen in seinem mengenmäßigen Anteil stufenweise reduziert und durch andere Erreger ersetzt. Die Herstellung von zwei S. schwarzengrund-Impfstoffen, die mit Kochsalz verdünnt wurden, dienten als Leerwert zum Vergleich der Wirkung einer verringerten Antigenmenge ohne andere zusätzliche Bakterienbeimengungen. Die Infektion wurde wie in der ersten Versuchsreihe intraperitoneal vorgenommen; als Infektionsmaterial diente eine S. schwarzengrund Bouillon.

Die Fragestellung, die aus der zweiten Versuchsanordnung folgt, sei in den Punkten IV bis VI zusammengefaßt.

IV) Entspricht die Abwehr, die von dem hier geprüften, breiten Kombinationsimpfstoff induziert wird, der, welche nach der intraperitonealen Infektion in der ersten Versuchsreihe zur Wirkung kam?

V) Wie unterscheidet sich der Immunitätsgrad nach Anwendung der verschiedenen Impfstoffkombinationen verglichen mit dem des spezifischen Impfstoffes und dem, der von dem unspezifisch gruppengleichen Impfstoff erreicht wird?

VI) Ist bei diesen verschiedenen Antigenkombinationen eine konkurrierende Wirkung mit einer Minderung der Abwehrleistung zu beobachten oder kann bei der stufenweisen Reduktion des spezifischen Antigenanteiles und einem Hinzufügen neuer Antigenbestandteile eine Adjuvanswirkung dessen mengenmäßige Verringerung ausgleichen? Läßt sich vielleicht eine Wirkungspotenzierung des S. schwarzengrund-Antigenes auf die Antikörperbildung erreichen?

Wenn es gelingt, mit einem oralen Impfstoff eine polyvalente, wirksame Abwehr gegen einen oder mehrere Erreger gleichzeitig aufzubauen, so wären die zahlreichen Vorteile, die eine orale Immunisierung gegenüber einer parenteralen bietet (38), um den einer größeren Breitenwirkung zu erweitern (28, 29, 32).

B. Material und Methoden der Versuchsreihe I

a) Versuchstiere

Zu allen Versuchen wurden Mäuse aus der Zucht des Robert-Koch-Institutes verwendet, und zwar weiße NMRI (Naval Medical Research Institute) Mäuse. Es waren insgesamt 1562 Tiere beiderlei Geschlechts etwa gleicher Altersstufe. Das mittlere Gewicht betrug 15-20 gr. Die Mäuse wurden während der Versuchsdauer in Plastikkäfigen getrennt zu je 20 bis 25 Tieren gehalten. Sie erhielten Trockenfutter „Altromin" und Leitungswasser. Für die Kontrollen galten die gleichen äußeren Bedingungen.

b) Impfstoffe

Ich habe in allen Versuchen Impfstoffe aus abgetöteten Bakterien verwendet. Zu der Herstellung in dieser Versuchsreihe dienten der Stamm Dyspepsie-Coli 2380 mit der Antigenformel O : 111 B : 4 H : 12, und der Keim Salmonella schwarzengrund, der die Antigenstruktur O 1, 4, 12, 27 Hd 1, 7 aufweist.

Die Bakterienkulturen wurden nach Verimpfen auf einfachen Agar 24 Stunden bei 37 Grad bebrütet und anschliessend mit phosphatgepufferter NaCl Lösung (ph 7,2) abgeschwemmt. In einem Thermostaten wurden sie bei 60 Grad über 75 Minuten inaktiviert. Die Anwendbarkeit konnte nach einer zehntägigen Sterilisationskontrolle, in der je 1 ccm der inaktivierten Impfstoffe in 100 ccm Bouillon bebrütet wurde, sichergestellt werden.

Ich kombinierte die Impfstoffe aus den beiden hitzeinaktivierten Bakterienkulturen, indem ich sie im Verhältnis 1 : 1 mischte. Ein Impfstoff, der nur S. schwarzengrund enthielt, wurde mit NaCl 1 : 1 aufgefüllt. Dieselbe Kochsalzverdünnung wurde auch für den Coliimpfstoff vorgenommen.

Die Keimzahl der getrennt hergestellten Impfstoffe betrug jeweils 10^9 Keime/ml.

c) Immunisierung

Ich teilte die 1562 Mäuse entsprechend der Zahl der anzuwendenden Impfstoffe in vier Gruppen ein. Die Tiere der ersten Gruppe erhielten den kochsalzverdünnten S. schwarzengrund-Impfstoff. Die zweite Gruppe wurde mit dem Coli-Kochsalzgemisch immunisiert, die dritte mit dem Kombinationsimpfstoff. Eine vierte Gruppe blieb als Kontrolle ohne Impfung. Jede Maus erhielt an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 0,25 ml Impfstoff oral mit der Sonde und nach 24stündiger Pause erneut je 0,25 ml für 5 Tage.

Ein Tier der ersten Gruppe erhielt demnach insgesamt 2,5 ml des Impfstoffes S. schwarzengrund und NaCl 1 : 1, der zweiten 2,5 ml E. Coli und NaCl 1: 1 und der dritten E. Coli und S. schwarzengrund 1 : 1 ebenfalls in der Menge von 2,5 ml oral gefüttert. Die orale Gabe wurde mit gebogenen Kanülen vorgenommen. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, daß bei der Antigenzufuhr keine Traumen gesetzt wurden. Die tägliche Impfung hat bei den Tieren keine äußerlich sichtbaren Zeichen einer gesundheitlichen Schädigung verursacht.

d) Infektion

Am zehnten Tage nach der letzten oralen Impfung wurde jede Maus, sowohl immunisierte wie ungeimpfte Kontrollen, intraperitoneal infiziert. Die Infektion wurde überkreuzt vorgenommen, das heißt, die eine Hälfte der Tiere erhielt 0,1 ml einer frischen Colibouillon, die zweite 0,1 ml einer S. schwarzengrund-Kultur als intraperitoneale Infektionsdosis. Die infizierende Keimzahl war für den Coli-Impfstoff auf $5,5 \times 10^9$ Keime/ml eingestellt, für den S. schwarzengrund-Impfstoff auf $5,6 \times 10^9$ Keime/ml.

C. Ergebnisse der Versuchsreihe I

Die Resultate der im Verlauf von dreieinhalb Monaten nacheinander durchgeführten vier Versuche 1-4 werden durch eine vergleichende Betrachtung der Mortalitätsziffern von geimpften und ungeimpften Kontrollen ersichtlich. Ein Wirkungsindex berechnet sich nach der Formel $WI = \frac{b-a}{b} \cdot 100$, wobei b die Kontrollwerte angibt und a für die Zahl der Todesfälle der immunisierten Tiere gesetzt ist. Eine statistische Sicherung der Ergebnisse nach KOLLER (18) wird in den Tabellen 4 und 8 durchgeführt.

Auf eine ergänzende serologische Untersuchung wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet. Hinsichtlich der Zusammenstellung der Impfstoffe, in der Dosierung und im Impfrhythmus wurden möglichst konstante Bedingungen eingehalten, da nur diese den Vergleich verschiedener Versuchsreihen erlauben (11).

Zunächst vergleiche ich die Versuchswerte in den Tabellen 1 bis 3, die ich nach einer Infektion mit dem Coli-Keim erhielt. Entsprechend der Immunisierungsanordnung hatte ich eine Tiergruppe mit S. schwarzengrund geimpft, also habe ich bei einer Coli-Infektion hier das Beispiel einer unspezifischen Immunisierung.

Tabelle 1

Versuch	Geimpfte			Kontrolle			Wirkungsindex
Nr.	n	†	%	n	†	%	
1	42	15	35,7	50	24	48,0	25,6
2	49	36	73,5	48	37	77,1	4,7
3	46	22	47,8	46	37	80,4	40,5
4	50	36	72,0	50	42	84,0	14,3
Gesamt:	187	109	58,3	194	140	72,2	19,6

Orale Immunisierung von 187 Mäusen mit einem Impfstoff aus S. schwarzengrund mit anschließender intraperitonealer In-

fektion mit E. Coli 2380. (n = Zahl der Gesamttiere,† = davon gestorbene Tiere, % der Mortalität).

In allen vier Versuchen ist die Sterberate der geimpften Tiere niedriger als die der Kontrollen. In Versuch Nr. 2 sind die Werte angenähert, so daß der Wirkungsindex nur einen niedrigen Wert erreicht. Im ersten Versuch beträgt die Mortalität der Kontrollen nur 48 v.H.; hier konnte ein Wirkungsindex von 25,6 erreicht werden. Dieser Wert wird von der dritten Versuchsreihe um fast das Doppelte übertroffen, so daß ersichtlich wird, daß bei einer niedrigen Infektionsbelastung auch eine unspezifische Impfung einen geringen Schutz zu verleihen scheint (21).

Bei der Zusammenfassung der vier Einzelversuche konnte jedoch nur ein Wirkungsindex von 19,6 erreicht werden. Dieser Wert ist nach Angabe der Tabelle 4 statistisch nicht mehr gesichert.

Die nächste der zu besprechenden Tiergruppen war mit dem Impfstoff E. Coli + NaCl 1 : 1 immunisiert worden. Es handelt sich um die spezifische Impfung, die als positive Kontrolle hier aufgeführt wird.

Tabelle 2

Versuch	Geimpfte			Kontrolle			Wirkungsindex
Nr.	n	†	%	n	†	%	
1	49	4	8,2	50	24	48,0	83,0
2	50	9	18,0	48	37	77,1	76,7
3	44	9	20,5	46	37	80,4	74,6
4	50	8	16,0	50	42	84,0	81,0
Gesamt:	193	30	15,5	194	140	72,2	78,8

Orale Immunisierung von 193 Mäusen mit einem Impfstoff aus E. Coli mit anschließender intraperitonealer Infektion mit einem E. Coli Stamm.

Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Mortalitätsziffer von geimpften Tieren und ihren Kontrollen. Die Mortalität der oral immunisierten Tiere ist in jedem Versuch über das Vierfache gesenkt. Der Wirkungsindex im 4. Versuch ist mit 81,0 am höchsten. Auch im Gesamtergebnis ist der Wirkungsindex mit 78,8 sehr gut und statistisch hoch signifikant gesichert (vergl. Tabelle 4).

In der dritten Gruppe hatte jede Maus täglich 0,25 ml des Kombinationsimpfstoffes aus S. schwarzengrund und E. Coli erhalten. Die folgende Tabelle 3 enthält das Ergebnis der Wirkung eines zweifach kombinierten Impfstoffes auf eine Infektion mit E. Coli.

Tabelle 3

Versuch	Geimpfte			Kontrolle			Wirkungsindex
Nr.	n	†	%	n	†	%	
1	45	2	4,4	50	24	48,0	90,7
2	45	15	33,3	48	37	77,1	56,7
3	43	14	32,6	46	37	80,4	59,5
4	47	8	17,0	50	42	84,0	79,8
Gesamt:	180	39	21,7	194	140	72,2	70,0

Orale Immunisierung von 180 Mäusen mit einem Kombinationsimpfstoff, aus gleichen Teilen einer S. schwarzengrund-Kultur und Colibouillon hergestellt, bei anschließender intraperitonealer Infektion mit E. Coli.

Wieder liegen die Mortalitätsziffern bei den immunisierten Tieren weit unter denen der rechts aufgeführten Kontrolltiere.

Im ersten Versuch konnte mit einem Wirkungsindex von 90,7 das Ergebnis der spezifischen Impfung übertroffen

werden. In Versuch 2 und 3 ist die Mortalitätsdifferenz bezogen auf die Kontrollwerte mehr als doppelt so hoch, im 4. Versuch wird ein fast fünffach höherer Wert erreicht. Der Wirkungsindex für die vier Versuche liegt mit 70,0 gering unter dem Ergebnis der spezifischen Impfung.

Tabelle 4

Immunisiert mit:	ENDMORTALITÄT % Geimpfte	Kontrolle	Db	Dz	Db/Dz = E	Wi
S.schwarzengrund	58,3	72,2	13,9	15,0	<1	19,6
Coli	15,5	72,2	56,7	13,0	4,4	78,8
S.schwarz. + Coli	21,7	72,2	50,5	14,8	3,3	70,0

Zusammenfassung und Signifikanzberechnung der Versuchsgruppen einer oralen Immunisierung von Mäusen mit einem spezifischen, einem unspezifischen und einem Kombinations-Impfstoff bei einer intraperitonealen Infektion mit E. Coli 2380.

In Tabelle 4 führe ich das Gesamtergebnis der E. Coli Infektion mit der statistischen Sicherung nach KOLLER (18) auf. In der obersten Reihe ist die unspezifische Impfung aufgeführt. Es folgt die spezifische und als letztes die Kombinationsimmunisierung. Der Wirkungsindex ist in der letzten Kolonne zusammengefaßt. Db gibt die jeweilige Differenz der Endmortalität von Kontrolltieren und immunisierten Mäusen an. Dz ist die höchstzulässige Zufallsdifferenz. Der Quotient aus beiden ergibt den Grad der statistischen Echtheit E. Dieser Faktor ist mit 4,4 hoch beweiskräftig für die Wirksamkeit einer oralen spezifischen Impfung. Die Kombinationsimmunisierung hat eine statistische Signifikanz von 3,3. Dieser Wert ist weit ausreichend für die Aussage, daß der geprüfte kombinierte Impfstoff gegen eine E. Coli-Infektion schützt. Die unspezifische Impfung fällt dagegen in ihrer Wirkung stark

ab. Der Quotient aus Db und Dz ergibt einen Wert, der unter 1 liegt, ein statistisch gesicherter Impferfolg konnte nicht erzielt werden.

Um einen weiteren Vergleich des Impferfolges zu ermöglichen, habe ich einen Leistungsindex aufgestellt. Er läßt sich aus der Formel

$$L = \frac{\text{Wirksamkeit d. unspezif. bzw. Kombinationsgeimpften}}{\text{Wirksamkeit d. spezif. Geimpften}} \times 100$$

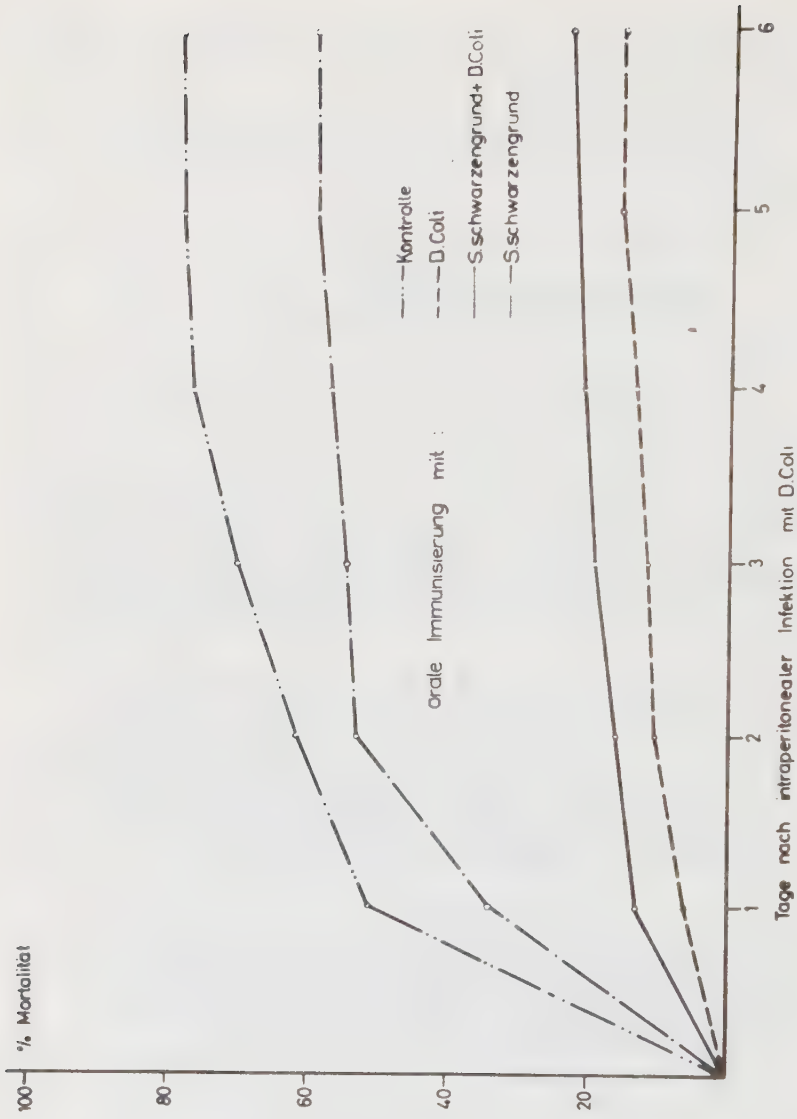
errechnen.

Der Leistungsindex aus dem Vergleich von unspezifischer zu spezifischer Impfung beträgt 25. Es liegt ein Leistungsabfall der unspezifischen Immunisierung zu seiner positiven Kontrolle von 75 vor. Der Leistungsindex für die Kombinationsimmunisierung ist 89, also ist die Wirkung der spezifischen Impfung um den Faktor 11 effektiver, da bei einem Faktor von 100 gleiche Wirksamkeit bestände.

In der ersten Abbildung werden die besprochenen Ergebnisse graphisch dargestellt. Ich habe den Impferfolg gemessen am prozentualen Anstieg der Einzeltage aus allen Versuchen zusammengefaßt. Die resultierende Absterbeordnung für die drei Immunisierungsgruppen werden hier zu der der Kontrollen graphisch in Beziehung gesetzt.

Abbildung 1

Summenkurve der Mortalität von 754 Versuchstieren, die mit einem unspezifischen S. schwarzengrund-Impfstoff, einem spezifischen Coli-Impfstoff und einer Kombination aus beiden immunisiert und mit einem virulenten E. Coli Stamm intraperitoneal infiziert wurden.



Der Impferfolg wird am Abstand zwischen dem Kurvenverlauf der Kontrollen und dem der spezifisch, sowie kombinationsgeimpften Tiere deutlich. Etwa 50 v.H. der Kontrolltiere erliegen der Erkrankung am ersten und am zweiten Tage. Der prozentuale Mortalitätsverlauf erscheint im weiteren Verlauf reduziert und ist nicht ganz typisch für ein

hochtoxisches Krankheitsbild, das die E. Coli-Infektion sonst hervorruft (vergl. Abb. 1 in 21). Die Kurve, die die unspezifische Immunisierung charakterisiert, verläuft ähnlich. Hier erfolgt eine leichte Verschiebung zu niedrigeren Mortalitätswerten und ein langsamerer Kurvenanstieg, was für eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit spricht. Die Absterbeordnungen der spezifisch geimpften und mit Kombinations-Impfstoff immunisierten Tiere sind in ihrem Verlauf flach und halten sich vom zweiten Tage ab auf gleichem Niveau; der gute Impfschutz zeichnet sich an der fehlenden Kurvensteigung deutlich ab.

Die Versuchsanordnung wurde am sechsten Tage der Versuchsdauer abgebrochen, da keine Änderung der täglichen Sterberate mehr eintrat. Die Angleichung der Mortalitätsziffern und der annähernd parallele Verlauf der Kurven von Geimpften und Nichtgeimpften, die bereits vom dritten Tage eintritt, könnte durch eine Aufbesserung des Abwehrsystems der letzteren bedingt sein. Oraler Kontakt mit infizierten Exkrementen und anderem infektiösem Material während einer Versuchsdauer wäre möglich (33).

Im Folgenden werden in den Tabellen 5 bis 7 die Resultate der Infektion mit dem Stamm S. schwarzengrund angegeben und in der Tabelle 8 statistisch gesichert. Die Werte der unspezifischen Immunisierung werden wieder zuerst aufgeführt. Bei einer S schwarzengrund-Infektion ist das daher die mit E. Coli geimpfte Tiergruppe.

Tabelle 5

Orale Immunisierung von 181 Mäusen mit einem Impfstoff aus E. Coli 2380 bei anschließender intraperitonealer Infektion mit S. schwarzengrund.

Versuch	Geimpfte			Kontrolle			Wirkungsindex
Nr.	n	†	%	n	†	%	
1	48	46	95,8	50	48	96,0	0,2
2	50	47	94,0	50	45	90,0	< 0
3	33	31	93,9	49	49	100,0	6,1
4	50	48	96,0	50	47	94,0	< 0
Gesamt:	181	172	95,0	199	189	95,0	< 0

Die prozentuale Sterblichkeit der Kontrollen liegt in allen Versuchen über neunzig. In Versuch Nr. 3 sind die Nichtgeimpften sogar zu 100 % ad exitum gekommen. Die Mortalitätsziffern der geimpften Tiere erreichen bis auf den ersten und dritten Versuch sogar höhere Werte als die Kontrolltiere. Die Wirkungsindices liegen für den zweiten und vierten Versuch unter Null, so daß insgesamt eine positive Wirkung nicht mehr meßbar ist.

Versuch	Geimpfte			Kontrolle			Wirkungsindex
Nr.	n	†	%	n	†	%	
1	49	16	32,7	50	48	96,0	66,0
2	46	18	39,1	50	45	90,0	56,5
3	49	41	83,7	49	49	100,0	16,3
4	50	32	64,0	50	47	94,0	31,9
Gesamt:	194	107	55,2	199	189	94,9	41,9

Tabelle 6

Orale Immunisierung von 194 Mäusen mit einem Impfstoff aus S. schwarzengrund mit anschließender intraperitonealer Infektion eines virulenten S. schwarzengrund Stammes.

In dieser tabellarischen Übersicht sind die Ergebnisse der spezifischen Impfung enthalten. Wegen der grossen Infektionsbelastung kommt es in der dritten und vierten Versuchsreihe zu relativ niedrigen Schutzwerten für die geimpften Tiere. Zu hohe infizierende Keimzahlen könnten den Impfschutz teilweise aufgehoben haben (17). Der Wirkungsindex als Ergebnis der dritten Versuchsreihe ist mit 16,3 sehr gering. Das Gesamtergebnis errechnet sich mit einem Wirkungsindex von 41,9, das positiv gewertet werden kann.

Tabelle 7

Orale Immunisierung von 187 Mäusen mit einem Kombinationsimpfstoff aus gleichen Teilen S. schwarzengrund und E. Coli 2380 und folgender intraperitonealer Infektion mit einem virulenten S. schwarzengrund Stamm.

Versuch	Geimpfte			Kontrolle			Wirkungsindex
Nr.	n	†	%	n	†	%	
1	41	15	36,6	50	48	96,0	61,9
2	48	16	33,3	50	45	90,0	63,0
3	48	37	77,1	49	49	100,0	22,9
4	50	34	68,0	50	47	94,0	27,7
Gesamt:	187	102	54,5	199	189	95,0	42,7

Der Impferfolg ist in den ersten beiden Versuchsanordnungen etwa gleich dem, den der spezifische S. schwarzengrundimpfstoff bewirkt hat. Im dritten Versuch wird die spezifische Wirkung noch übertroffen. Bei der Zusammenfassung der Wirkungsindices resultiert ein Wert, der über dem Gesamtindex der vorigen Tabellenübersicht liegt. Bei der statistischen Auswertung der obigen Befunde wird das Besprochene noch deutlicher.

Tabelle 8

Zusammenfassung und Signifikanzberechnung der Versuchsgruppen einer oralen Immunisierung von Mäusen mit einem spezifischen, einem unspezifischen und einem Kombinationsimpfstoff bei einer intraperitonealen Infektion mit S. schwarzengrund.

Immunisiert mit :	ENDMORTALITÄT %		Db	Dz	Db/Dz = E	Wi
	Geimpfte	Kontrolle				
S.schwarzengrund	55,2	95,0	39,8	15,0	2,7	41,9
Coli	95,0	95,0	—	5,0	< 1	< 0
S.schwarz. + Coli	54,5	95,0	40,4	14,8	2,7	42,7

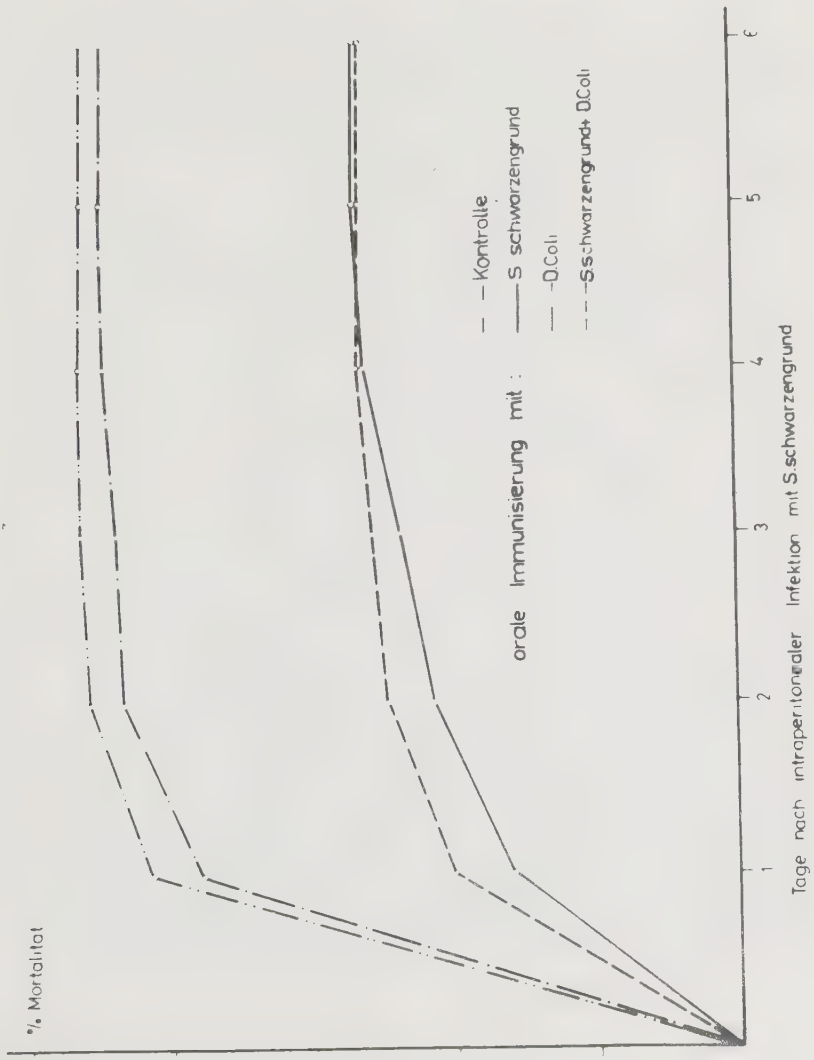
Die spezifische Impfung in der ersten Reihe erreicht bei einem Wirkungsindex von 41,9 eine statistische Signifikanz von E = 2,7. Das Ergebnis der unspezifischen Immunisierung ist statistisch nicht mehr gesichert, da der Quotient aus Db/DZ unter 1 liegt. Der Wert für die Kombinationsimmunisierung erzielt den Echtheitsgrad von 2,7 und entspricht damit dem Ergebnis der S. schwarzengrundimmunisierung.

Der Leistungsindex aus dem Verhältnis der Wirksamkeit von unspezifisch geimpften Tieren zu der der mit spezifischem Impfstoff immunisierten Tiere ist nicht meßbar. Der Leistungsindex für den Kombinationsimpfstoff hat mit L = 102 den Effekt des spezifischen Impfstoffes übertroffen, da bei L = 100 gleiche Wirksamkeit vorliegen würde.

In der zweiten Abbildung werden die Absterbeordnungen der vier Tiergruppen nach einer intraperitonealen S. schwarzengrundinfektion zeichnerisch zusammengefaßt.

Abbildung 2

Summenkurve der Mortalität von 761 Versuchstieren, die mit einem spezifischen, einem unspezifischen und einem Kombinationsimpfstoff immunisiert und anschließend mit einem virulenten S. schwarzengrundstamm intraperitoneal infiziert wurden.



Der akut toxische Krankheitsverlauf wird an dem steilen Kurvenverlauf deutlich. Am ersten Tage sterben über 80 v.H. der nichtgeimpften Tiere. Den zweiten Tag post infectionem liegt die Sterberate über 90 v.H. Vom dritten Tage verläuft die Absterbekurve parallel zur Abzisse.

Wie die Tabelle 5 zeigte, so wird auch hier deutlich, daß der unspezifische Impfstoff fast gar keinen Schutz verleiht. Die Absterberate ist im Anstieg und damit prozentualer Sterblichkeit der Einzeltage ähnlich der der Kontrolltiere und nur gering nach unten in Richtung niedrigerer Mortalitätswerte verschoben.

Deutlich ist der Abstand der beiden unteren Kurven zu dem Kurvenverlauf der Kontrollen und der nichtgeimpften Tiere. Vergleicht man die zahlenmäßigen Angaben der Endmortalitäten der spezifischen und Kombinationsimpfung in den Tabellen 6 und 7 und deren statistische Sicherung in der Tabelle 8, so zeigte sich dort kein großer Unterschied. Der Wirkungsindex war nicht einmal um den Faktor 1 different, der statistische Echtheitsgrad E ist für beide Gruppen gleich. Jedoch hier in der graphischen Darstellung fällt eine Differenz auf, die sich am Abstand und unterschiedlicher Steilheit der Kurvenverläufe manifestiert. Beide Kurven zeigen im Vergleich zu oben den lansamen, flachen Anstieg und sind vom vierten Tage einander angeglichen. Überraschend ist die deutliche Verspätung der unteren Absterbeordnung, in der die Endmortalitäten für die spezifisch geimpften Tiere aufsummiert sind. Am ersten Tage liegt hier die Mortalität bei 30 v.H., während die kombinationsgeimpften Tiere schon zu 40 v.H. ad exitum gekommen sind. Erst am vierten Tage wird die unterschiedliche Sterbegeschwindigkeit angeglichen. Obwohl zahlenmäßig keine Differenz zwischen den beiden Immunisierungsformen festzustellen war, ist hier nun ersichtlich,

daß die spezifische Impfung in den ersten Versuchstagen einen größeren Schutz verlieh, was sich an der verlängerten mittleren Überlebenszeit zeigt.

D. Material und Methoden der Versuchsreihe II

a) Versuchstiere

Ich habe wieder mit NMRI Mäusen beiderlei Geschlechts in den folgenden Versuchen gearbeitet. Für die Kontroll- und die übrigen Tiere galten die gleichen Bedingungen, wie bereits vorne aufgeführt. Die Anzahl der Mäuse betrug 2379. Zwei Versuchsansätze mußten wegen interkurrenter Ektromyelieinfekte abgebrochen werden.

b) Impfstoffe

Dreizehn Bakterienarten dienten zur Impfstoffherstellung, zehn Salmonellenspezies, zwei Colistämme und ein Stamm Shigella flexneri. Ich führe sie im folgenden mit der zugehörigen Antigenformel auf.

Salmonella Species:

Gruppe B:	S.schwarzengrund	O 1,4,12,27	d 1,7
	S.typhi murium	O 1,4,12,5	i 1,2
Gruppe C1:	S.infantis	O 6,7	r 1,5
	S.bareilly	O 6,7	y 1,5
	S.thompson	O 6,7	k 1,5
Gruppe C2:	S.münchen	O 6,8	d 1,2
	S.manchester	O 6,8	e v 1,7
	S.blockley	O 6,8	k 1,5
	S.newport	O 6,8	e h 1,2
Gruppe D 1:	S.enteritidis	O 1,9,12	gm

Dyspepsie-Coli Species:

	D-Coli 2380 (Rowley)	O 111 B 4 H 12
	D-Coli	O 125 K 7oH 19

Shigella Species:

	Shigella flexneri 1b	11 12 (y) z

Wieder erfolgte eine Bebrütung der Bakterienkulturen bei 37° und eine Abschwemmung von den Agarschalen mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung (ph 7,2). Die Keime wurden auf einen Titer von 10^9/ml eingestellt, nachdem sie in einem Thermostaten bei 60 Grad über 75 Minuten inaktiviert und auf ihre Sterilität geprüft waren. Ich kombinierte sieben Impfstoffe, deren konstante Anteile für jeden Versuchsansatz erneut zusammengestellt wurden. Mit jedem neuen Impfstoff ist der Anteil von spezifischem S. schwarzengrund reduziert und von anderen Keimen ersetzt worden. Ich bezeichne die verwendeten Impfstoffe der Übersicht halber mit den Buchstaben A-G und führe sie mit der differierenden Antigenzusammenstellung hier auf. Um einen vergleichbaren Leerwert zu erhalten, sind in zwei der Impfstoffe NaCl-Mischungen statt einer zusätzlichen Antigenbeimengung vorgenommen worden, so daß das spezifische Antigen allein in der betreffenden Verdünnung zur Wirkung kommt.

Impfstoff A:	S.schwarzengrund	16/16
Impfstoff B:	S.typhi murium	16/16
Impfstoff C:	S.schwarzengrund je	4/16
	S.typhi murium	"
	S.newport	"
	E.Coli	"
Impfstoff D:	S.schwarzengrund je	2/16
	S.typhi murium	"
	S.newport	"
	S.münchen	"
	S.manchester	"
	E.Coli 2380	"
	E.Coli O 125	"
	S.blockley	"

Impfstoff E:	In 8/16 Anteil Keime wie oben und zusätzlich		
	Shigella flexneri		4/16
	S.infantis	je	1/16
	S.bareilly		"
	S.thompson		"
	S.enteritidis		"
Impfstoff F:	S.schwarzengrund + NaCl 2/16 : 14/16		
Impfstoff G:	S.schwarzengrund + NaCl 1/16 : 15/16		

c) Immunisierung

Die 2379 Tiere der zweiten Versuchsgruppe erhielten im Rhythmus von zwei mal je fünf Tagen mit eintägiger Zwischenpause täglich 0,25 ml Impfstoff oral sondiert. Ein gesundheitlicher Schaden wurde nicht beobachtet.

Diesmal waren die Mäuse entsprechend der Impfstoffanzahl in acht Gruppen aufzuteilen. Die erste Gruppe wurde mit dem Impfstoff A immunisiert. Ein Tier dieser Fraktion bekam insgesamt 2,5 ml · 10^9 Keime S. schwarzengrund oral appliziert. Ein Tier der zweiten Gruppe erhielt 2,5 ml · 10^9 Keime des Impfstoffes B, der dritten 2,5 ml · 10^9 Keime des Impfstoffes C und so fort. Die achte Fraktion der Mäuse blieb als Kontrolle ungeimpft.

d) Infektion

Die Tiere sind am 10. Tage nach der Beendigung der Immunisierung mit einer unverdünnten S.schwarzengrund-Bouillon intraperitoneal infiziert worden. Sowohl für die geimpften Mäuse als auch für die Kontrollen betrug die Infektionsdosis 0,1 ml. Der Keimtiter war auf 10^8/ml eingestellt, was einer mittleren Sterberate bei den Kontrollen entsprechen sollte. In zwei der Versuchsreihen lag die Mortalität der Kontrollmäuse zu hoch. Der Keimtiter wurde daher von 4,6 · 10^8 in Versuch 5 und 6 auf 3,0 · 10^8 für die nächsten Versuchsreihen variiert.

E. Ergebnisse der Versuchsreihe II

Wie in der vorigen Anordnung wird die Immunitätslage an dem Vergleich der Mortalitätsrate der geimpften und nichtgeimpften Tiere gewertet, und der Wirkungsindex aus beiden Endmortalitäten errechnet.

Da die Versuchsanordnungen möglichst konstant gehalten waren, beruhen Wirkungsunterschiede nicht auf verschiedener Impfstoffherstellung, sondern aus der Variation der Erregerkombinationen oder auch auf der Zusammensetzung aus spezifischem Antigenanteil und unspezifischer Antigenmischung in den unterschiedlichen Mengenverhältnissen.

Die Resultate dieser Versuchsgruppe werden folgend tabellarisch aufgeführt und besprochen (Tabelle 9-15). Anschließend wird die statistische Sicherung nach KOLLER (18) in der Tabelle 16 veranschaulicht. Die Abbildungen 3 und 4 machen das Besprochene am Ende der Tabellenübersichten graphisch deutlich.

Zunächst sei die spezifische Impfung in ihrer Wirkung als positive Kontrolle aufgeführt.

Versuch	Geimpfte			Kontrolle			Wirkungsindex
Nr.	n	†	%	n	†	%	
5	49	36	73,5	48	46	95,8	23,3
6	48	34	70,8	38	38	100,0	29,2
7	49	11	22,5	48	29	60,4	62,8
8	50	13	26,0	50	20	40,0	35,0
9	48	23	47,9	49	26	53,1	9,8
Gesamt:	244	117	48,0	233	159	68,2	29,7

Tabelle 9

Orale Immunisierung von 244 Mäusen mit einem Impfstoff aus S.schwarzengrund mit anschließender intraperitonealer Infektion des gleichen Stammes.

In den beiden ersten Versuchen hat die Infektion bei den Kontrollen sehr hohe Mortalitätsziffern verursacht. Die hohe Keimzahl, die später auf eine niedrigere einreguliert wurde, bedingt auch eine hohe prozentuale Sterblichkeit der immunisierten Mäuse. Der Wirkungsindex liegt in beiden Fällen unter 30, der Impferfolg ist für eine spezifische Immunisierung mäßig. Einen Wirkungsindex von 62,8 erreicht Versuch Nr. 7 und entspricht damit dem Ergebnis der Tabelle 6 und Tabelle 1 (letzteres in 17). Die fünfte Versuchsreihe Nr. 9 fällt aus diesem Bild heraus. Bei diesen Streuungen des Impferfolges mit einem Gesamtergebnis von nur 29,7 (der Gesamtindex der spezifischen Versuchsreihe der Tabelle 6 hatte 41,9 betragen) könnten interkurrente Infekte und jahreszeitliche Schwankungen beteiligt sein (27,33). Die beiden letzten Tiergruppen waren im Frühjahr oral geimpft worden und zwei der Versuche mußten wegen einer Ektromyelieverseuchung des Stalles abgebrochen werden. Beides könnte den Impfschutz negativ beeinflußt haben.

Ich stelle der spezifischen die unspezifische Impfung gegenüber.

Versuch	Geimpfte			Kontrolle			Wirkungsindex
Nr.	n	†	%	n	†	%	
5	48	46	95,8	48	46	95,8	0
6	47	42	89,4	38	38	100,0	10,6
7	48	6	12,5	48	29	60,4	79,3
8	50	3	6,0	50	20	40,0	85 0
9	48	16	33,3	49	26	53,1	37,2
Gesamt:	241	113	46,5	233	159	68,2	31,2

Tabelle 10

Orale Immunisierung von 241 Mäusen mit einem Impfstoff aus S. typhi murium bei anschließender intraperitonealer Infektion mit S. schwarzengrund.

Die hohe Infektionsbelastung führt in Versuch 5 und 6 zu einer großen Sterblichkeit der Geimpften; der erste Wirkungsindex beträgt Null, der zweite ist mit dem Wert 10,6 auch sehr niedrig. Auffallend ist das Ergebnis der drei nächsten Versuchsgruppen. Der unspezifische Impfstoff, bei dem eine Antigengemeinschaft mit dem spezifischen Impfstoff vorliegt, konnte hier eine bessere Schutzwirkung als dieser erreichen. Der zusammengefaßte Index liegt mit 31,2 über dem in der vorigen Tabelle angegebenen. Wieder ist zu erwägen, daß bei einer relativ geringen Infektionsbelastung auch eine unspezifische Impfung einen gewissen Schutz verleiht (21).

Versuch	Geimpfte			Kontrolle			Wirkungsindex
Nr.	n	†	%	n	†	%	
5	48	39	81,3	48	46	95,8	15,2
6	39	33	84,6	38	38	100,0	15,4
7	48	11	22,9	48	29	60,4	62,1
8	50	7	14,0	50	20	40,0	65,0
9	46	24	52,2	49	26	53,1	1,7
Gesamt:	231	114	49,4	233	159	68,2	27,7

Tabelle 11

Orale Immunisierung von 231 Mäusen mit einem oralen Kombinationsimpfstoff aus 4/16 Anteilen S. schwarzengrund und 12/16 Anteil anderer Keime bei anschließender intraperitonealer Infektion mit S. schwarzengrund.

Die Mortalitätsziffern der beiden oberen Versuche liegen zwischen den Werten der spezifisch und unspezifisch immunisierten Tiere. Die dritte Versuchsreihe entspricht etwa dem dritten Versuch der S. schwarzengrundimmunisierung, die vierte erreicht einen besseren Schutzwert als diese. Der Gesamtindex liegt mit 27,7 gering

unter dem Wirkungsindex, der für die Wirkung der spezifischen Impfung in Tabelle 9 angegeben war.

Versuch	Geimpfte			Kontrolle			Wirkungsindex
Nr.	n	+	%	n	+	%	
5	50	35	70,0	48	46	95,8	27,0
6	39	37	94,9	38	38	100,0	5,1
7	50	11	22,0	48	29	60,4	63,6
8	48	4	8,3	50	20	40,0	79,2
9	48	33	68,8	49	26	53,1	< 0
Gesamt:	235	120	51,0	233	159	68,2	25,2

Tabelle 12

Orale Immunisierung von 235 Mäusen mit einem Kombinationsimpfstoff aus 2/16 Anteilen S. schwarzengrund und 14/16 Anteilen anderer Keime bei folgender intraperitonealer Infektion mit einem S. schwarzengrundstamm.

Bei diesem Impfstoff, in dem nur noch 2/16 S.schwarzengrund-Antigen enthalten ist, liegen die Wirkungsindices in den Versuchsreihen mit zu hoher infizierender Keimzahl wie zu erwarten niedrig. Versuch Nr. 7 ergibt einen guten Schutz und paßt sich damit dem Bilde an, das diese Versuchsreihen in den bisherigen Gruppen ergab. In der achten Versuchsreihe kann ein Wirkungsindex von 79,2 angegeben werden, also ein Ergebnis, das die 4/16 Kombination übertrifft und auch von der mit reinem S. schwarzengrund geimpften Tiergruppe nicht erreicht wurde. Der Gesamtindex ist im Vergleich zu den bereits besprochenen Versuchen gering zu einem niedrigeren Wirkungsbereich verschoben.

Versuch	Geimpfte			Kontrolle			Wirkungsindex
Nr.	n	†	%	n	†	%	
5	45	34	75,6	48	46	95,8	21,2
6	36	30	83,3	38	38	100,0	16,7
7	47	13	27,7	48	29	60,4	54,2
8	49	5	10,2	50	20	40,0	74,5
9	49	19	38,8	49	26	53,1	26,9
Gesamt:	226	101	44,7	233	159	68,2	34,5

Tabelle 13

Orale Immunisierung von 226 Mäusen mit einem Impfstoff aus 1/16 Anteilen S. schwarzengrund und 15/16 Anteilen anderer Keime.

Auffällig ist bei dieser Kombinationsgruppe, daß ein guter Wirkungsindex von 74,5 in dem Versuch Nr. 8 zu vermerken ist; er gleicht dem, den die S. typhi murium-Impfung zeigte. Bei der Zusammenfassenden Betrachtung liegt der Wirkungsindex mit 34,5 über allen bisher aufgeführten Impfgruppen und übertrifft sowohl die spezifisch als auch die unspezifisch geimpfte Gruppe. Besonders der günstige Verlauf der Versuche Nr. 7 und 8 dürfte zu diesem Ergebnis geführt haben.

Tabelle 14

Orale Immunisierung von 235 Mäusen mit einem Impfstoff aus 2/16 S. schwarzengrund und 14/16 NaCl und anschliessender intraperitonealer Infektion mit einem S. schwarzengrundstamm.

Versuch	Geimpfte			Kontrolle			Wirkungsindex
Nr.	n	†	%	n	†	%	
5	50	44	88,0	48	46	95,8	8,2
6	38	31	81,6	38	38	100,0	18,4
7	48	23	47,9	48	29	60,4	20,7
8	49	7	14,3	50	20	40,0	64,2
9	50	24	48,0	49	26	53,1	9,5
Gesamt:	235	129	54,9	233	159	68,2	19,6

In dieser Gruppe, in der die Mäuse mit einem kochsalzverdünnten Impfstoff immunisiert worden waren, finden sich nicht wesentlich differente Werte zu den bereits vorher aufgeführten. Die ersten beiden Endmortalitätswerte liegen hoch, da mit einer hohen Keimzahl infiziert wurde, der Wirkungsindex ist niedrig. Der Versuch Nr. 8 ergibt einen guten Impferfolg, die 9. Versuchsreihe fällt in ihrem Schutz ab. Der Gesamtindex beträgt 19,6; die Wirkung eines verdünnten Impfstoffes ist dem aus einer Antigenkombination unterlegen, wenn man die Indexhöhe der übrigen Gruppen vergleichend betrachtet.

Versuch	Geimpfte			Kontrolle			Wirkungsindex
Nr.	n	†	%	n	†	%	
5	50	46	92,0	48	46	95,8	4,0
6	39	36	92,3	38	38	100,0	7,7
7	49	20	40,8	48	29	60,4	32,4
8	50	10	20,0	50	20	40,0	50,0
9	48	23	47,9	49	26	53,1	9,7
Gesamt:	236	135	57,2	233	159	68,2	16,2

Tabelle 15

Orale Immunisierung von 236 Mäusen mit einem Impfstoff aus 1/16 Anteil S. schwarzengrund und 15/16 Anteilen NaCl und anschließende intraperitoneale Infektion mit einem S. schwarzengrundstamm.

Noch deutlicher wird der Abfall der Wirkung bei dieser Verdünnung. Der Wirkungsindex für alle Versuche beträgt nur 16,2. Die hohe infizierende Keimzahl der ersten beiden Versuche hatte hier mit die stärkste negative Wirkung, wie aus den niedrigen Wirkungsindices ersichtlich ist. In den Versuchen Nr. 7 und 8 ist noch ein recht gutes Ergebnis erzielt worden, welches aber die schwache Leistung bei der Gesamtbewertung nicht genügend beeinflussen kann.

Die nächste Tabelle faßt die Ergebnisse in ihrer statistischen Auswertung noch einmal zusammen.

Wi	Immunisiert mit :	ENDMORTALITÄT %		Db	Dz	Db/Dz =E	Leistungsindex
		Geimpfte	Kontrolle				
29,7	16/16 S. schwarz.	48,0	68,2	20,3	13,7	1,5	100
31,2	16/16 typhimurium	46,9	68,2	21,3	13,6	1,5	105
27,7	4/16 S.schw+Keime	49,3	68,2	18,9	13,9	1,4	94
25,2	2/16 S.schw+Keime	51,0	68,2	17,2	13,4	1,3	85
34,5	1/16 S.schw+Keime	44,7	68,2	23,6	14,2	1,7	116
19,6	2/16 S.schw+NaCl	54,9	68,2	13,3	13,4	1,0	66
16,1	1/16 S.schw+NaCl	57,2	68,2	11,0	13,4	0,8	54

Tabelle 16

Zusammenfassung und Signifikanzberechnung der Versuchsgruppen 5 bis 9 für einen Vergleich der Leistung der oralen Immunisierung mit unterschiedlich gemischten Kombinationsimpfstoffen, einem spezifischen und unspezifischen Impfstoff bei einer intraperitonealen Infektion mit einem S. schwarzengrundstamm.

Ganz links sind die Wirkungsindices der sieben Immunisierungsgruppen, die aus den Endmortalitäten von

Kontrollen und geimpften Tieren - in Spalte 3 und 4 - berechnet wurden, aufgeführt. Der Quotient der beobachteten Differenz der Mortalitäten Db und der größtzulässigen Zufallsdifferenz Dz ergibt den in der vorletzten Spalte genannten statistischen Echtheitsgrad E. Er liegt für die ersten Gruppen über 1, ein Impferfolg ist damit statistisch gesichert. Den höchsten Wert erreicht die 1/16 Kombination, dann folgt die unspezifische und die spezifische Impfungsgruppe. Für die Verdünnung 2 : 16 errechnet sich der Wert 1,0, so daß ein Impferfolg gerade noch als statistisch signifikant gelten kann. Der mit Kochsalz 1/16 verdünnte Impfstoff erreicht diese statistische Signifikanz von 1 nicht, so daß ein Impferfolg hier statistisch nicht mehr beweisbar ist.

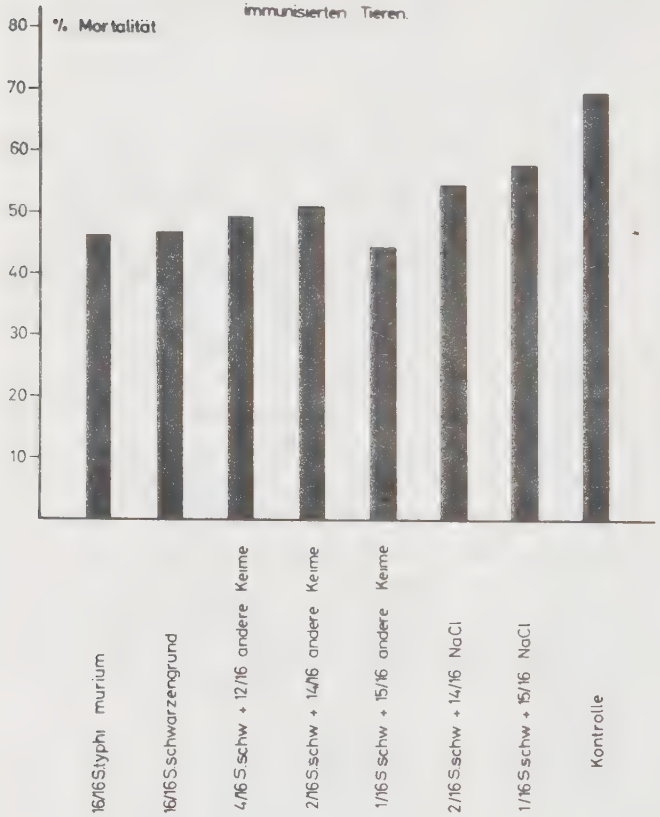
Aus der Errechnung der Leistungsindices, in der die Wirksamkeit der spezifisch geimpften Tiere gleich Hundert gesetzt wird und man die übrigen Immunisierungsgruppen darauf bezieht, wird wieder ersichtlich, daß die 1/16 Kombination den besten Wert mit einem Leistungsindex von L = 116 hat. Es folgt die unspezifische Immunisierung mit L = 105; die übrigen Leistungsindices liegen unter 100. Es liegt ein stetiger Leistungsfall bis zu der stärksten Kochsalzverdünnung vor, nur die 1/16 Antigenkombination macht hier eine Ausnahme.

In der Abbildung 3 wird die Mortalität der acht immunisierten und nichtgeimpften Tiergruppen, die sich bis zu dem fünften Tag der Versuchsdauer einstellt, graphisch dargestellt. Ich habe den fünften Tag gewählt, da an den folgenden Tagen des Versuches keine für das Gesamtbild wesentlichen Änderungen mehr eintraten.

Abbildung 3

Darstellung der Mortalität aus fünf Versuchstagen von 1881 Versuchstieren und deren Kontrollen. Die Tiere sind mit einem spezifischen, einem unspezifischen und drei verschieden kombinierten Impfstoffen sowie zwei als Leerwert dienenden S. schwarzengrundkochsalzverdünnungen oral immunisiert und anschließend mit einem S. schwarzengrundstamm intraperitoneal infiziert worden.

Vergleichende Darstellung für die Mortalität des 5. Tages von Kontroll- sowie mit Kombinations-, spez.+ unspez. Impfstoff immunisierten Tieren.



Es wird nochmals ersichtlich, daß die unspezifische Impfung als erste Säule, eine um weniges niedrigere Endmortalität aufweist als die spezifische Impfung mit S. schwarzengrund. Entsprechend der Verringerung des spezifischen Antigenanteiles in der Kombination scheint die Säulenhöhe, welche die Endmortalität bildlich wiedergibt, ständig zuzunehmen. Die Kontrollsäule liegt am weitesten zu hohen Mortalitätswerten verschoben. Die Kochsalzverdünnungen 2 : 16 und 1 : 16 sind dem angenähert, erreichen aber nicht dieselbe Stufe, so daß ein Impferfolg hier doch abzulesen

ist. Die Säule, die der Mortalität des 1/16 Kombinationsimpfstoffes entspricht, fällt aus dem Gesamtbild heraus; hier könnte eine Adjuvanswirkung des unspezifischen Impfstoffanteiles die mengenmäßige Verringerung des spezifischen Antigenes ausgeglichen haben, so daß ein sämtliche Immunitätsgruppen übertreffender Impfschutz erreicht wurde.

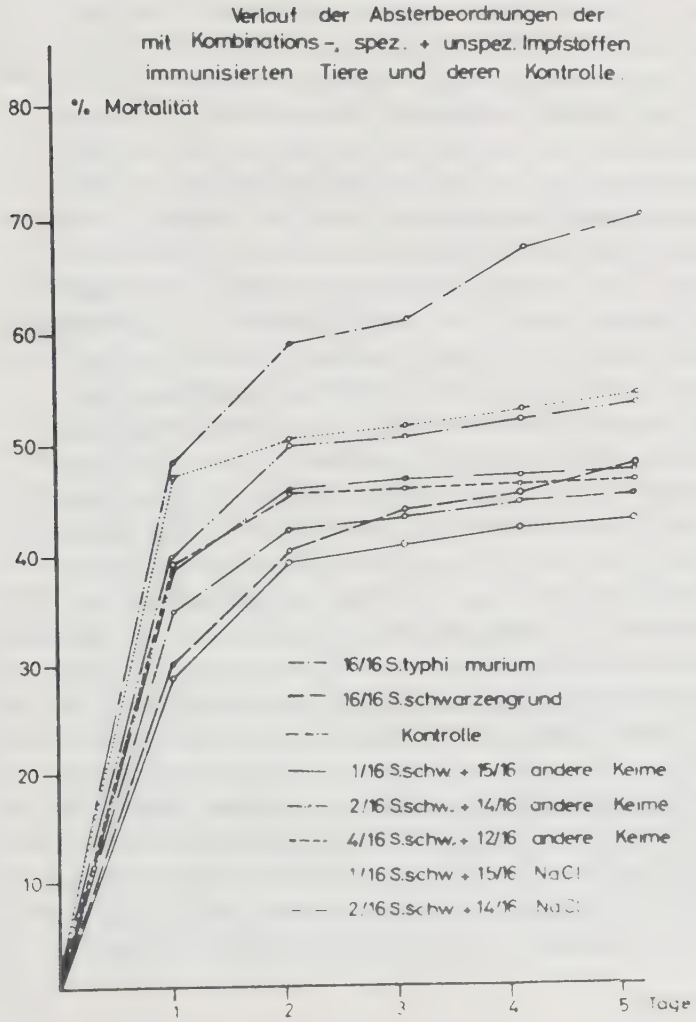


Abbildung 4

Summenkurve der Mortalität von 1881 Versuchstieren, die mit einem spezifischen, einem unspezifischen und den verschiedenen Impfstoffkombinationen oral immunisiert und anschließend mit einem virulenten S. schwarzengrund-keim intraperitoneal infiziert wurden.

In dieser Abbildung werden die Absterbeordnungen der geimpften und ungeimpften Tiere verglichen. Es handelt sich bei der S. schwarzengrund-Infektion um einen toxischen Krankheitsverlauf. Die Steilheit der Kontrollkurve, die die Toxizität repräsentiert, erreicht hier aber nicht das gleiche Ausmaß wie in Abbildung 2, wo die gleiche Infektion für die ersten Versuchsreihen zeichnerisch festgehalten war. Es ist zu berücksichtigen, daß hier mit niedrigeren Keimzahlen infiziert worden ist, und die Mortalität der Kontrollen vom dritten Versuch eine mittlere war. 60 v.H. der nichtgeimpften Mäuse sterben in den ersten beiden Tagen. Am 5. Tage liegt die prozentuale Sterblichkeit bei 70 v.H. Der Impferfolg ist wieder an dem Abstand der Kontrollkurve zu dem der jeweiligen Immunisierungsgruppe abzulesen. Die verschiedenen Impfstoffgruppen zeigen einen ähnlichen Verlauf. Auch bei den geimpften Tieren kommt in den ersten Tagen der größte Teil der Mäuse ad exitum. Vom dritten Tage an wird der Kurvenverlauf flach, es treten keine wesentlichen Schwankungen bis zum Versuchsabbruch mehr auf. Um es an Hand der Abbildungen erneut zu wiederholen: der Impferfolg für die 1/16 Kombination ist der beste, da die betreffende Kurve den weitesten Abstand von der Kontrollkurve aufweist. Es folgt die unspezifische und als drittes die spezifische Impfgruppe. Die beiden Kurven für die Kochsalzverdünnungen liegen der Absterbeordnung der ungeimpften Tiere am nächsten, ein geringer Schutz vor einer intraperitonealen Infektion ist aber abzulesen, da sich eine deutliche Annäherung zu niedrigen Mortalitätswerten abzeichnet, und die Tiere eine verzögerte Sterbegeschwindigkeit aufweisen.

F. Diskussion

Es war zunächst die Frage gestellt, ob die orale Immunisierung mit einem spezifischen, einem unspezifischen und einem Kombinationsimpfstoff Schutz vor einer intraperitonealen Infektion bieten kann. Beim Vergleich der drei Impfgruppen zeigte sich der deutliche Schutz der spezifischen und kombinationsgeimpften Tiere in beiden Infektionsgruppen, dagegen der deutliche Abfall des unspezifischen Impfschutzes. Bei der intraperitonealen Infektion wird die natürliche Barriere der Darmwand umgangen; gegen diese unphysiologische Art der Infektionsbelastung war das unspezifische Abwehrsystem wirkungslos, nicht jedoch das der beiden anderen Versuchsgruppen. Der von ihnen induzierte Schutz ist nicht nur in die Darmwand zu lokalisieren, sondern reicht über die intestinale Schranke hinaus, da virulente Bakterien in ihrer Ausbreitung gehemmt werden konnten. Von der oralen Impfung mit spezifischem und kombiniertem Antigen ist eine allgemeine Immunität induziert worden.

Die Annahme einer allgemeinen Immunität nach oraler Immunisierung wird von zahlreichen Autoren bestätigt (2, 3, 15, 17, 19, 20, 21, 36, 41, 44, 49, 51); sie widerlegt die veraltete französische Schulmeinung nach METSCHNIKOFF, HIRSCH und BESREDKA, daß die orale Impfung nur eine begrenzte „Organimmunität" hervorrufe (1, 13, 23). Von MRUGOWSKI (25) wird die allgemeine Immunität als ein humorale verstanden, die ein sekundärer Vorgang einer zellulär lokalen Abwehr sein soll. Beide Immunitätsformen sollen aber relativ unabhängig voneinander wirken. Diese humorale Abwehr scheint die viel spezifischere zu sein, denn die orale Impfung mit einem Erreger differenten Antigenaufbaus konnte keinen immunisatorischen Schutz bei den Versuchstieren erzielen, der Mortalitätsverlauf war foudroyant. Ein wirksamer Schutz, der auch bei fehlender

Übereinstimmung von immunisierendem und infizierendem Antigen eintritt (15, 17, 20, 25, 47) wäre in die Darmwand zu lokalisieren. Er kommt bei dem intraperitonealen Infektionsmodell nicht zur Geltung, da die Darmwand als natürliche Barriere umgangen wird (19).

Als nächstes war die Frage zu untersuchen, welche der möglichen Antigenwechselwirkungen in der Beziehung zueinander : ein Synergismus, eine Konkurrenz der Antigene oder das Fehlen einer gegenseitigen Beziehung zu beobachten sein würde (10). Zunächst will ich darauf eingehen, ob aus den Ergebnissen eine Konkurrenz der Antigene herauszulesen ist. Wenn ich die Konkurrenz der Antigenwirkung nicht nach HENNESSEN und Mitarbeitern (11) als eine Antigenbeeinflussung im Sinne eines „Wettbewerbes" auffasse, der auch zu einer Wirkungssteigerung führen könnte, sondern als ein „crowding out", eine gegenseitige Unterdrückung, so ist diese Wirkung hier nicht zu beobachten. Eine wechselseitige Hemmung mit der Folge einer Impfstoffwirkung, die der Einzelkomponente nicht mehr entspricht (4, 10, 14, 28, 46), findet nicht statt. Die Kombination mit S. schwarzengrund führt nicht zu einer Wirkungsminderung des Coliantigenes bei der Coliinfektion. Der Impferfolg des Mischimpfstoffes lag nur wenig unter dem des spezifischen Antigenes. Noch war das S. schwarzengrund-Antigen durch die Mischung bei der Infektion mit dem korrelierenden Keim beeinträchtigt. Der Schutzwert des kombinierten Antigenes lag sogar zahlenmäßig über dem des ungemischten Keimes; dieses hatte jedoch einen günstigeren Einfluß auf die mittlere Überlebenszeit wie die graphische Abbildung verdeutlichte.

Wenn ein synergistischer Effekt eines polyvalenten Impfstoffes durch eine gegenseitige Stimulierung der Antigene bestimmt wird, so daß ein größerer Schutz entsteht, als wie ihn das Einzelantigen bewirkt (10, 12, 28, 42, 45, 46, 48), so könnte ein Synergismus bei dem zweiten

Teil der ersten Versuchsgruppe das gute Ergebnis der Kombinationsimpfung verursacht haben. Bei der Kombinationsimmunisierung und anschließender E. Coli Infektion sieht das Ergebnis eher so aus, als ob die Keime simultan aber unabhängig voneinander immunisieren, ohne gegenseitige Beeinflussung, so daß von einer Addition ihrer Immunisierungswirkung gesprochen werden könnte. Bei einer solchen wäre ein unabhängiger Einfluß auf die spezifische Antikörperbildung und auf einen hier wegen der intraperitonealen Infektion nicht mit einbezogenen unspezifischen Schutzmechanismus anzunehmen.

Über die Anwendung oraler Kombinationsimpfstoffe sind die Versuche von LUMIERE und CHEVROTIER interessant (22), während neuere Literaturangaben fehlen und daher nicht mit in die Diskussion einzubeziehen sind. Den angegebenen Autoren gelang eine Impfung mit einem Typhus- und Paratyphus- sowie Colistamm oral gegen die getrennte Gabe einer tödlichen Dosis je eines der drei Erreger. Der Impfstoff war aus den drei Keimen im Anteil ihrer Toxizität hergestellt worden. In der zweiten Versuchsreihe hier war die Mischung der Impfstoffe nicht nach Gesichtspunkten der Toxizität erfolgt. Die verschiedenen Bakterien wurden nicht nach der Beziehung von Virulenz und mengenmäßigem Impfstoffanteil zusammengestellt. Es sind die Keime als eine unspezifische Einheit dem spezifischen Erreger in ihrer stufenweisen Variation der Mengenverhältnisse gegenübergestellt. Da wieder intraperitoneal infiziert wurde und damit das humorale Abwehrsystem angesprochen wurde, zeigt sich in den Ergebnissen wie in der ersten Versuchsreihe vorwiegend die Wirkung der spezifischen Immunität. Diesem spezifischen Schutz, „bei dem zumindest das lymphatische System des Bauchraumes mit einbezogen wird" (36, S. 186) steht der unspezifisch lokale, der vermutlich auf der Bildung von Antikörpern in der Darmschleimhaut, insbesondere von Coproantikörpern und Opsoninen beruht, gegenüber (9, 24, 34, 43, 47).

An Hand der tabellarischen Übersichten und Abbildungen konnte die positive Wirkung, welche die verschiedenen oralen Kombinationsimpfstoffe hier leisten, verdeutlicht werden. Was die Impfstoffe an immunisatorischen Vorgängen in der Darmwand erreichen, ist auch bei dieser Versuchsreihe nicht direkt zu messen, wäre aber indirekt bei einem Adjuvanseffekt auf die spezifisch bedingte Immunitätslage abzulesen. Versteht man unter einer Adjuvanswirkung nach H. FINGER (8) die Steigerung des Antigenreizes mit einer folglich größeren Produktivität der Antikörperbildung, so wäre zu erwägen, ob aus den Endergebnissen eine solche herauszulesen ist.

Nach DRESCHER (7) hängt die "Wirksamkeit von Kombinationsimpfstoffen von der Mischungsrelation der Einzelkomponente ab". Das Verhältnis der Antigendosis zum Immunisierungsgrad wird von PRIGGE (27) nach dem "Weber Fechnerschen" Gesetz formuliert, "daß der Schutzwert eines Impfstoffes nicht in der Weise steigt wie sein Gehalt an spezifischem Substrat". Diese Aussagen, sowie Versuche, in denen Impfstoffe aus S. typhi murium bis zu einer Verdünnung von 1/1000 gegeben wurden und gegen eine orale Infektion schützten (35), weisen darauf hin, daß niedrige Antigenmengen zum Aufbau einer schützenden Immunität ausreichen und daß die stetig reduzierte Menge spezifischer Antigene in meinen kombinierten Impfstoffen die erzielte Immunität hätte bewirken können. Bei den Versuchen hier ist jedoch zu beachten, daß alle Impfstoffkombinationen und besonders die, in der das spezifische Antigen auf 1/16 reduziert wurde, einen signifikanten Impfschutz erreichen, und die Kochsalzverdünnung gar keinen bzw. einen an der Grenze der statistischen Signifikanz liegenden Schutz erzielen. Gerade das gute Ergebnis der 1/16

Kombination könnte doch durch eine potenzierte Wirkung des spezifischen Antigenes bedingt sein. Das heißt also, daß die unspezifische Immunität, die in die Darmwand zu lokalisieren ist, die spezifische humorale sekundär beeinflussen würde. Da ich in meiner Versuchsanordnung künstlich intraperitoneal infiziert habe, wäre es durchaus denkbar, daß sich diese Beeinflussung steigern ließe, wenn ich eine natürliche orale Infektionsbelastung wählte. Die durch die orale Impfung induzierte, in der Darmwand lokalisierte Abwehr würde aktiviert und könnte sekundär die humorale Immunität beeinflussen. Dieser Einfluß könnte sich vielleicht im Sinne einer Wirkungspotenzierung auswirken, da ein virulentes Bakterienantigen ausreicht, um das ganze unspezifische Abwehrsystem in der Darmwand, an das möglicherweise eine große Anzahl spezifischer Einzelabwehrleistungen gekoppelt sind, zu mobilisieren. Hierzu sei noch einmal MRUGOWSKY genannt (25), der nach oraler Immunisierung gegen Typhus und Paratyphus die Ausschüttung von Ruhragglutininen beobachtete, da "die immunkompetenten Zellen die Bildung der Ruhrantikörper gelernt hatten" (S. 161). Unspezifische Erreger wären also durchaus fähig, in das spezifische Immunsystem einzugreifen und es zu stimulieren, vielleicht in dem Ausmaß, daß es zu einer potenzierten Einzelimmunisierungsleistung käme. Zusammenfassend möchte ich noch einmal feststellen, daß sich ein geringer Einfluß der unspezifischen auf die spezifische Immunität in meinen Ergebnissen spiegelt, da die Kombinationsimpfstoffe noch einen deutlich signifikanten Impfschutz erreichen. Man kann in diesem Falle von einem Synergismus der Antigenwechselwirkung sprechen, der wahrscheinlich deutlicher wäre, wenn eine Identität von Immunisierungs- und Infektionsweg vorläge.

Eine Konkurrenz in der Beziehung der Antigene ist hier so wenig wie aus den Ergebnissen der ersten Versuchsreihe herauszulesen. Im Unterschied zur ersten Versuchsreihe ist hier zu beachten, daß die unspezifische Impfstoffkomponente S. typhi murium eine Antigengemeinschaft mit S. schwarzengrund aufweist. Das gute Ergebnis des parallelen Einzelversuches zeigt, daß bei einer Übereinstimmung von somatischen Antigenen ein unspezifischer Erreger vor einer intraperitonealen Infektion schützen kann. Diese "paradoxe Immunisierung" auf parenteralem Wege ist bekannt (26), so wie die Erscheinung einer Kreuzimmunität, wenn oral immunisiert und infiziert (34, 49, 51) oder als Vergleich besser, wenn man oral immunisiert und die Infektion parenteral vornimmt (15, 19, 20). Bei dem angedeuteten Adjuvanseffekt wäre daher S. typhi murium besonders geeignet, in das spezifische Abwehrsystem synergistisch einzugreifen.

Bei der Fragestellung einer möglichen Anwendung eines oralen Kombinationsimpfstoffes wäre zunächst festzuhalten, daß verschiedene Antigene in einem oralen Impfstoff ohne eine durch Konkurrenz bedingte Wirkungsminderung zu kombinieren sind. Es sieht so aus, als ob zumindest eine Addition der Immunisierungswirkungen ohne gegenseitige Beeinflussung der Antigene möglich ist, die einen positiven Einfluß auf die schützende Immunität ausüben, obwohl die Menge des spezifischen Antigenes stark reduziert wurde. Die Versuchsergebnisse weisen sogar darauf hin, daß die mögliche Addition der kombinierten Impfstoffwirkung von zwei oder mehr Erregern sogar noch übertroffen wird durch einen Synergismus des unspezifischen Anteiles auf das spezifische Antigen. Die Forderung, die an einen Mischimpfstoff

gestellt wird, nämlich gegen mehrere Erreger zu schützen, wäre schon bei einer alleinigen Addition der Immunisierungswirkungen gegeben, um so mehr, wenn wie hier angedeutet, die Möglichkeit einer gegenseitig positiv synergistischen Wirkung besteht. Ein oraler Kombinationsimpfstoff würde also den Vorzug einer größeren Breitenwirkung gegenüber einem parenteralen Impfstoff bieten, da er einmal erregerunspezifisch wirkt und zum anderen eine Vielzahl von verschiedenen Antigenen ohne eine Wirkungsminderung simultan in ihrer Immunisierungswirkung vereinigt.

G. Zusammenfassung

Die Untersuchungen an Mäusen über die Wirksamkeit von Kombinationsimpfstoffen aus Enterobakteriaceaen gegen eine intraperitoneale Infektion ergaben:

1) Eine orale spezifische Immunisierung zeigte in allen Fällen einen statistisch signifikanten Impfschutz.

2) Die parallele unspezifische Immunisierung als negative Kontrolle blieb ohne Erfolg bei fehlender Übereinstimmung im Antigenaufbau von immunisierendem und infizierendem Keim. Einen deutlichen Impfschutz zeigte die Impfung mit S. typhi murium bei der Infektion mit S. schwarzengrund. Hier war von der oralen Immunisierung eine Kreuzimmunität, bei Gleichheit der O Antigene 1, 4, 12 mit dem infizierenden Keim, erreicht worden.

3) Die von der oralen Impfung induzierte Immunität reicht über den lokalen unspezifischen Schutz in der Darmwand hinaus und bewirkt eine weitere, wesentlich spezifischere Abwehr.

4) Bei der Kombination von zwei oder mehreren Antigenen wurde eine konkurrierend hemmende Wirkung nicht beobachtet. Ein synergistischer Effekt war angedeutet; er war nicht eindeutiger nachzuweisen, weil bei dem intraperitonealen Infektionsmodus vorwiegend die spezifische Seite der Immunität geprüft wird, nicht aber die unspezifisch in die Darmwand zu lokalisierende, die ihren Einfluß auf das humorale Abwehrsystem erst bei Identität von Infektions- und Immunisierungswegen voll geltend machen könnte.

5) Bei der stufenweisen Reduktion des spezifischen Antigenes und dem Hinzufügen anderer Antigene zu den Impfstoffkombinationen der zweiten Versuchsreihe reichte die reduzierte Menge des spezifischen Antigenes schließlich nicht mehr aus, um eine wirksame Immunisierung hervorzurufen. Bei der Verdünnung des spezifischen Antigenes mit nicht spezifischem Bakterienantigen wurde in jedem Falle ein signifikanter Schutz erzielt. Hier könnte ein adjuvierender Effekt der unspezifischen Komponente beteiligt sein.

6) Mischimpfstoffe sind für die orale Impfung zu empfehlen, weil gegen mehrere Erreger gleichzeitig ohne eine Wirkungsbeeinträchtigung einer der Impfstoffanteile geschützt werden kann.

H. Literaturverzeichnis

1) Besredka, A. — Die lokale Immunisierung. Verlag von J.A.Barth Leipzig 1926

2) Brückner, G. — Über orale Immunisierungsversuche. Zschr.f.Immunfschg. 8, 439 (1911)

3) Chvostek, F. — Die Immunisierung per os. Wien.klin.Wschr. 453, 1908

4) Dale, H. Hartley, P. — Immunologische Analyse der komplexen Struktur des Serumeiweißes. Zschr.f.Hyg. 96, 191 (1922)

5) De Mello, F. Suctancar, B. — Infection et immunité des pigeons et des souris blanches vis à vis du bacille paratyphique B. Compt.rend.Soc.Biol. 101, 393 (1929)

6) Domingo, P. — Sur l'immunisation anti-typhoidique par voie buccale. Compt.rend.Soc.Biol. 110, 733 (1932)

7) Drescher, J. — Experimente über die Beziehungen zwischen Antigenzufuhr und Antikörperbildung bei Kombinationsimpfstoffen. Compt.rend. 6ieme Congres internat.de Stand.Microbiol. 163, 1960

8) Finger, H.
Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Wirkungsweise der Freundschen Adjuvantien.
Arch.f.Hyg.u.Bakt. 146 (1962)

9) Freter, R.
Gangarosa, E.
Oral Immunisation und production of coproantibodoes in human volunteers.
Journ.Immunol. 91, 724 (1963)

10) Gärtner, H.
Schutzimpfungen.
in: Reploh, H. u. Otte, H.: Lehrbuch d.med. Mikrobiol.
Verlag G. Fischer 116, 1965

11) Hennessen, W.
Mauler, R.
Körner, L.
Experimentelle Untersuchungen über die Konkurrenz der Antigene.
Zschr.f.Hyg. 148, 61 (1961)

12) Hennessen, W.
Allgemeines über kombinierte Impfstoffe.
in: Herrlich, A.: Handbuch der Schutzimpfungen.
Verlag Springer 652, 1965

13) Hirsch, J.G.
Immunity of infectious diseases: Review of some concepts of Metschnikoff.
Bact.Rev. 23, 48 (1959)

14) Imai, G. — Studien über die Beeinflussung der Antikörperbildung in Gemischen von Antigenen. Zschr.f.Immunfschg. 43, 312 (1925)

15) Jandl, G. — Experimentelle Untersuchungen zum Mechanismus der oralen Typhusimmunisierung. Zschr.f.Hyg. 151, 34 (1965)

16) Kinne Saffran, E. — Tierversuche zur oralen Impfung gegen menschenpathogene, Enteritis erregende Salmonellen. Inaug.Diss.Med.Fak. Berlin 1967

17) Kinne Saffran, E.
Kurschilgen, E.
Marquardsen, A.
Raettig, H. — Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 9. Mitt. Zbl. f.Bakt. I Orig. 208, 37 (1968)

18) Koller, S. — Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. Verlag: T. Steinkopp Dresden u. Leipzig 1940

19) Kurschilgen, E.M. — Vergleichende Tierversuche zur oralen Impfung gegen menschenpathogene, Enteritis erregende Salmonellen. Inaug.Diss.Med.Fak. Berlin 1969

20) Lange, B.
Yoshioka, M.
Beobachtungen über Infektion und Immunität beim Mäusetyphus.
Zschr.f.Hyg. 101, 451 (1924)

21) Lietz, B.
Raettig, H.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
V.Mitt.Zbl.f.Bakt. I Orig. 204, 543 (1967)

22) Lumière, A.
Chevrotier, J.
Die Typhusschutzimpfung vom Magendarmkanal aus.
Münch.med.Wschr. 739, 1914

23) Metschnikoff, E.
Etudes sur l'immunité. (4ieme mémoire)
L'immunité des cobayes vaccinés contre le vibrio Metschnikowii.
Ann.Inst.Past. 5, 465 (1891)

24) Mochmann, H.
Ocklitz, H.W.
Schmidt, E.F.
Hering, L.
Millek, J.
Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Natriumdesoxycholatextrakt aus Dyspepsiecoli Stämmen. 3. Mitt.
Zbl.f.Bakt. I Orig. 203, 14 (1967)

25) Mrugowski, J.
Zur Frage der zellulären Immunität beim Menschen nach peroraler Immunisierung.
Zschr.f.Immunfschg. 102, 153 (1942)

26) Oelrichs, L. — Weitere Untersuchungen über die zweckmäßige Zusammensetzung des Typhusimpfstoffes. Zbl.f.Bakt. I Orig. 140, 94 (1937)

27) Prigge, R. — Diphterie Schutzimpfung mit hochaktiven Impfstoffen. Weichhardt's Erg.d.Hyg. 22 1 (1939)

28) Raettig, H. — Typhusimmunität und Schutzimpfung. Verlag Gustav Fischer, Jena 1952

29) " — Die aktive Immunisierung gestern, heute, morgen. Wien.med.Wschr. 113, 366 (1963)

30) " — Empfehlenwerte Immunprophylaxe bei bakteriellen Darmerkrankungen. Zschr.f.ärztl.Fortbildung 56, 484 (1967)

31) " — Die Immunprophylaxe der bakteriellen Ruhr. Bundesgesundheitsblatt 15, 229 (1967)

32) " — Die Wirksamkeit der Oralimmunisierung gegen Typhus und Paratyphus. Die gelben Hefte der Behringwerke Nr. 8 379, 1964

33) Raettig, H. Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 1. Mitt. Zbl.f.Bakt. I Orig. 193, 398 (1964)

34) " Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 2. Mitt. Zbl.f.Bakt. I Orig. 197, 368 (1965)

35) " Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 3. Mitt. Zbl.f.Bakt. I Orig. 203, 478 (1967)

36) " Neue tierexperimentelle Ergebnisse zur lokalen Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigem Antigen. Zbl.f.Bakt. I Orig. 204, 185 (1966)

37) " Therapie und Prophylaxe der Salmonellaausscheidung durch orale Immunisierung. Zbl.f.Bakt. I Orig. 205, 439 (1967)

38) Raettig, H.
Die lokale Immunisierung mit inaktiviertem Antigen gegen bakterielle Darminfektionen.
Zbl.f.Bakt. I Ref. 183, 1 (1962)

39) "
Die Entwicklung der oralen Choleraschutzimpfung.
Zbl.f.Bakt. I Ref. 210, 465 (1968)

40) "
Neue Modellversuche zur Infektabwehr des Darmes.
Zbl.f.Bakt. I Orig. 198, 206 (1965)

41) "
Tierexperimente zur Durchlässigkeit des Intestinaltraktes für Virus.
Zbl.f.Bakt. I Orig. 191, 97 (1963)

42) Ramon, G.
Zoeller, Ch.
Les vaccins acossiés par union d'une anatoxine et d'un vaccin microbien (TAB) ou par mélange d'anatoxine.
Cómpt.rend.Soc.Biol. (Paris) 106, 94 (1926)

43) Rauss, K.
Kétyi, J.
Serum and coproantibodies in mice immunized peroraly with Shigella Flexneri.
Zschr.f.Immunfschg. 127, 37 (1964)

44) Reiter, H.
Versuche über perorale Immunisierung.
Dtsche.med.Wschr. 946, 1926

45) Schmitz, K.E.F.
Über einseitige Immunisierung mit Typhus- und Choleraimpfstoff.
Berl.klin.Wschr. 572, 1915

46) Stitz, B.
Gibt es eine Konkurrenz der Antigene?
Ein Beitrag zur Frage der aktiven Immunisierung mit Mischimpfstoffen.
Zbl.f.Bakt. I Orig. 143, 437 (1938)

47) Torikata, R.
Imaizumi, H.
Zum Unterschied zwischen Injektions- und der oralen Immunisierung.
Zschr.f.Immunfschg. 94, 342 (1938)

48) Weber, R.
Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Schutzimpfung gegen Typhus und Cholera.
Zschr.f.Immunfschg. 82, 391 (1961)

49) Wolf, K.
Die Immunisierung per os.
Münch.med.Wschr. 270, 1908

50) Yaoui, H.
Combined active immunisation against small pox and typhoid fever. (Clinical studies).

51) Yoshida, E.
Über Immunisierung per os.
Arch.f.Hyg. 69, 21 (1909)

Herrn Professor Dr. H. Raettig möchte ich hiermit herzlich für die Überlassung des Themas, die Anleitung bei der Abfassung der Arbeit und die stetige Bereitschaft zu Diskussionen und freundlichen Beratungen danken.

Curriculum Vitae

Am 13. April 1942 wurde ich, Angelika Marquardsen, als Tochter des Arztes Dr.med. Frank Marquardsen und seiner Ehefrau Annie geb. von Zitzewitz in Berlin geboren. Ich besuchte die Grundschule in Berlin-Kladow bis 1951 und anschließend die 10. Grundschule in Berlin-Wilmersdorf, der ich bis 1954 angehörte. Ab 1954 war ich dann Schülerin der Marie-Curie-Schule, einer Oberschule wissenschaftlichen Zweiges, und erhielt hier am 3. März 1961 das Zeugnis der Reife. Am 18. Oktober 1961 wurde ich an der Freien Universität Berlin für die medizinische Fakultät eingeschrieben. Am 14. August 1962 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 27. Oktober 1964 die ärztliche Vorprüfung und am 20. März 1968 das Staatsexamen.